

PROYECTO FIN DE GRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES



***“BIODEGRADABILIDAD METANOGENICA
TERMOFÍLICA DE BIORESIDUOS Y
GLICERINA. EVOLUCIÓN MICROBIANA”.***

***“THERMOPHILIC METHANOGENIC
BIODEGRADABILITY OF BIOWASTE AND
GLYCERIN. MICROBIAL EVOLUTION”.***

Autor: M^a Luisa Muñoz Rueda

Tutores: Diego Sales y Rosario Solera

*Departamento de
Tecnología del Medio
Ambiente.*

*Universidad de Cádiz,
2014*

INDICE

1. RESUMEN	1
2. ANTECEDENTES	2
3. OBJETIVOS	7
4. MATERIALES Y MÉTODOS	7
4.1. Plan de trabajo	7
4.2. Técnicas analíticas	9
4.2.1. Caracterización físico-química	10
4.2.2. Caracterización microbiológica	14
4.3. Equipos utilizados	16
4.3.1. Sistema semiautomático de ensayos de biodegradabilidad anaerobia de 12 posiciones.	16
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
6. CONCLUSIONES	29
7. BIBLIOGRAFÍA	29

1. RESUMEN

La normativa vigente propone como forma de valorización de los biorresiduos o residuos orgánicos biodegradables la biometanización o digestión anaerobia. El objetivo general de este trabajo de investigación es el estudio de la biodegradabilidad metanogénica termofílica de la codigestión anaerobia de la Fracción Orgánica de los Residuos Sólidos Urbanos (FORSU) y glicerina. Es decir, comprobar si la adición de glicerina a la digestión anaerobia de FORSU, mejora el proceso. Además, se han cuantificado las principales poblaciones de microorganismos anaerobios que intervienen en el proceso para establecer una comparación entre las diferentes condiciones ensayadas. .

El uso de estos dos productos en la digestión anaerobia reduce el excedente de residuos generados, convirtiendo su biodegradabilidad en una valorización excelente cuya finalidad es la obtención de metano, subproducto utilizado para la generación de energía.

El ensayo de biodegradabilidad metanogénica se realizó en un rango de temperatura termofílico (55° C) y en régimen discontinuo de operación. Se empleó un batería de 12 reactores que se inocularon al 40% con efluente procedente de un reactor monoetapa termofílico. Se ensayaron dos concentraciones de glicerina al 0,5% y al 1%, tres réplicas por cada condición, y se comparó con las réplicas que contenían FORSU únicamente. La alimentación de FORSU en los reactores fue del 30%. Se analizaron muestras al inicio y al final del ensayo, para poder comparar y sacar conclusiones en base a características físico-químicas y microbiológicas de las muestras analizadas.

Los resultados obtenidos muestran que la digestión anaerobia de FORSU presenta una biodegradabilidad superior en un 46,43% a la FORSU con adición de glicerina al 0,5% y superior en un 60,72% cuando la adición de glicerina fue del 1%. La adición de glicerina, sustrato altamente biodegradable, provoca una rápida acidificación de los reactores, consecuencias de las primeras etapas del proceso de degradación. Aunque los valores de pH se mantienen dentro del rango de neutralidad, la alcalinidad de los reactores con glicerina no es suficiente para mantener la relación acidez/alcalinidad menor a 0,4, necesaria para alcanzar la estabilidad.

ABSTRACT

The current laws propose the biomethanization or anaerobic digestion as a means of recovery of organic waste or biodegradables.

The main objective of this work is the study of the methanogenic thermophilic anaerobic biodegradability of organic fraction co-digestion of organic waste (FORSU). If the addition of glycerol to the process improves it or not. The main populations of anaerobic microorganisms involved in the process are also quantified compared to between the different tested conditions. The use of these two products in anaerobic digestion of waste over waste generated by society today, becoming an excellent biodegradability assessment aimed at obtaining methane, a byproduct used for power generation. In addition, the major populations of anaerobic microorganisms involved in the process have been quantified in order to establish a comparison between the different test conditions.

Some tests were performed in the thermophilic temperature range. An operating batchwise 12 battery reactors at 40% with a single stage effluent reactor was used. Results were compared to those from FORSU containing only. FORSU feed in reactors was 30%. Samples at the beginning at of the test were analyzed in order to compare and draw conclusions based on physico-chemical and microbiological characteristics of the samples.

The main results obtained show that the anaerobic digestion of FORSU 46.43%, and 60.72% biodegradable when adding glycerol 0.5% and 1% was. The addition of glycerol, highly biodegradable substrate, causes quick acidification reactions, in the first stages of degradation. Although pH values remain within the range of neutrality, alkalinity glycerol reactor is not enough to maintain the AGV/ alkalinity ratio less than 0.4, needed to achieve stability.

2. ANTECEDENTES

A causa del crecimiento exponencial de la población y al estilo de vida de las sociedades desarrolladas, se ha producido un aumento progresivo de los residuos sólidos urbanos (RSU). En Andalucía se alcanzó la cifra de 4.972.248 t/año en el año 2008, lo que corresponde a un ratio de 1,66 kg por habitante y día, según establece el **Decreto 397/2010**, del 2 de noviembre, por el que se aprueba el Plan Director

Territorial de Residuos No Peligrosos de Andalucía 2010-2019. En él se pretende mejorar la gestión de los residuos andaluces y poder optar a su posterior valorización. La normativa estatal en materia de residuos, **Ley 22/2011**, de 28 de julio de residuos y suelos contaminados, establece que los biorresiduos deben destinarse al compostaje o a la digestión anaerobia, en particular de la fracción vegetal, los biorresiduos de grandes generadores y los biorresiduos generados en los hogares.

Haciendo uso de las dos normas, se está obligado a destinar la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos (FORSU) a ser valorizada y cumplir así con los porcentajes de reducción de las cantidades máximas de biorresiduos destinados a vertederos, según se exponen en el Plan Nacional Integrado de Residuos 2008-2015 (**PNIR**). Los porcentajes de reducción dentro del periodo 2006-2015 son: 75% (2006). 50% (2009) y 35% (2015).

Para conseguir tales propósitos, una de las formas es la valorización de los residuos por biometanización o digestión anaerobia; obteniendo dos productos importantes, metano e hidrógeno, que pueden ser utilizados como fuente de energía, gracias a la transformación de la materia orgánica en ausencia de oxígeno y con ayuda de microorganismos, en su mayoría bacterias y arqueas, que hacen todo el trabajo de la descomposición. Dentro del reactor anaerobio conviven en sinergia todas las poblaciones microbianas responsables de las etapas del proceso metanogénico. En el sistema se genera hidrógeno, debido a la existencia de bacterias hidrolíticas que realizan el proceso de la hidrólisis, también se lleva a cabo la acidogénesis, debido a bacterias acidogénicas. Una vez concluidos estas etapas, se obtiene, entre otros productos, el hidrógeno, siendo el gas más importante en este estadio. A continuación se produce la metanogénesis gracias a las arqueas metanogénicas. Todo el sistema se lleva a cabo en un rango de temperatura termofílico (55°C). Este proceso de valoración energética está amparado bajo la normativa **D 2010/75/CE** del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre las emisiones industriales (IPPC).

Además de biogás, la digestión anaerobia proporciona otro producto importante a nivel comercial. Se trata del efluente, residuo ya digerido, que garantiza unas condiciones físico-químicas estables para su uso como fertilizante natural tras haber sido sometido a un tratamiento de compostaje aerobio y lograr su valorización total. El tratamiento a

seguir para los productos fertilizantes viene recogido en el **RD 824/2005**.

La digestión anaerobia de la FORSU es objeto de investigación del Grupo Tecnologías del Medio Ambiente desde hace más de dos décadas dentro de nuestra universidad. En proyectos previos del Plan Nacional de I+D+i (PPQ2001-4032; CTM2004-01655, CTM2007-62164 y CTM2010_17654) y proyectos de Excelencia del Plan Andaluz de Investigación (TEP-1085 y TEP-2472). El grupo ha investigado el tratamiento integral de la FORSU fomentando la producción de biogás con alto contenido en metano o bien tanto la producción de metano como la producción adicional de bio-hidrógeno en la fase acidogénica. De hecho en la etapa de arranque, las metanógenas utilizadoras de hidrógeno constituyen un 92% de la población y en la etapa de estabilización disminuyen hasta un 32% (Montero, 2008).

En los ensayos se han utilizado la FORSU proveniente del Centro Integral de Tratamiento de RSU, “Las Calandrias”, situada en Jerez de la Frontera (Cádiz). La fracción orgánica es separada mediante un trómel situado en la planta de traje. Es una planta industrial en la que parte de los residuos viene mezclado en origen por lo que la FORSU puede contener otros materiales no biodegradables a pesar de su triaje.

Como bien indica el **PNIR 2008-2015**, es necesario potenciar la realización de estudios de valorización de la fracción orgánica. Es interesante evaluar el grado de mejora al utilizar un residuo más enriquecedor, como la glicerina, en materia orgánica que la FORSU, para esta manera conseguir producir mayor cantidad de biocombustible en los procesos de biohidrógeno y biometanización. Estudios previos de digestión anaerobia de residuos sólidos urbanos con adición de glicerina (1%v/v) muestran que la producción de hidrógeno y metano se incrementa en un 114 % y 50%, respectivamente, gracias a la adición de glicerina, la relación C/N de la digestión anaerobia es cercana a su óptimo de 25:1 (Fountoulakis, 2009).

La glicerina utilizada en el ensayo es un subproducto que se obtiene en la producción del biodiesel, procedente de la instalación de Abengoa bioenergía situada en San Roque (Cádiz), dedicada a la producción de biocombustibles y bioproductos químicos, basado en la transesterificación de aceites vegetales o grasas animales con metanol.

La glicerina es una sustancia fácilmente biodegradable, presentando un pH adecuado para los procesos anaerobios y además se puede almacenar durante largos periodos de

tiempo, por lo que resulta un co-sustrato ideal para la digestión anaerobia. Además, existen una gran variedad de microorganismos que utilizan la glicerina como fuente carbonada en condiciones anerobias: *Clostridium*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Lactobacillus* (Da Siva, 2009).

De la misma manera que con la FORSU se revaloriza el residuo digerido que podría utilizarse de igual forma para producir compost. Regulado por el **RD 824/2005**.

Este estudio se enmarca dentro del proyecto de investigación titulado “Valorización integral de residuos sólidos urbanos y subproducto de la producción de biocombustibles” (CTM 2012-35654). Anteriormente la mayoría de los trabajos previos del grupo de investigación sobre el tratamiento integral de la FORSU mediante digestión anaerobia, se centraron mayormente en el análisis del comportamiento y variación de los parámetros físico-químicos, aunque Montero (2006) y Zahedi (2013) han caracterizado la dinámica poblacional de algunos de los principales microorganismos implicados en este proceso en reactores anaerobios monoetapa.

En la presente memoria se estudia la población microbiana encargada de toda la valorización de la FORSU y de la glicerina. La microbiología de la digestión anaerobia corresponde a dos grandes grupos microbianos: bacterias productoras de los ácidos, llamadas acidogénicas, en la etapa acidogénica, y las arqueas formadoras de metano, en la etapa metanogénica. (McCarty, 1981).

En la etapa acidogénica, las **bacterias hidrolíticas-acidogénicas**, hidrolizan y fermentan los compuestos orgánicos complejos (carbohidratos, lípidos y proteínas), transformándolos en compuestos más simples (ácidos orgánicos, aldehídos, alcoholes, CO₂ e H₂) mediante reacciones de oxidación reducción. A causa de la producción de ácidos el pH desciende hasta valores de 5.5 o puede ser aún menor, si no hubieran organismos capaces de metabolizar tal sustrato. En esta etapa se generan una serie de subproductos que luego serán fundamentales para las siguientes etapas: ácidos orgánicos (acetato, propionato, butirato, valerato...), alcoholes, amoníaco (NH₃⁻), H₂ y CO₂. La mayoría de la bacterias encargadas del proceso pertenecen al género *Clostridium* (Lee et al., 2009). Durante la hidrólisis y la acidogénesis se producen grandes cantidades de H₂, llegando a producir proporciones de hasta un 27-57 % del volumen del biogás producido (Romero et al., 2013; Zahedi et al., 2013).

En la etapa metanogénica, las **arqueas metanogénicas** son las encargadas de metabolizar el sustrato finalmente transformado en CH_4 y CO_2 , mayoritariamente, a partir de un grupo limitado de sustratos: $\text{H}_2\text{-CO}_2$, *acetato*, *metanol* y *mono-, di- y tri-aminas*, en condiciones estrictas de anaerobiosis (pH, altos tiempos de duplicación) muy estrictas en referencia a las bacterias hidrolíticas acidogénicas (BHAs) (Pohland and Ghosh 1971; De la Rubia et al., 2009). Las arqueas metanogénicas pertenecen al grupo primitivo de procariotas independientes de las bacterias (Woese et al., 1977); de las cuales se conocen un total de 5 órdenes agrupados en 4 familias (Zahedi, 2013). Las arqueas metanogénicas poseen una serie de factores y cofactores implicados en las reacciones de óxido-reducción que hacen única su actividad (Montero, 2006). Las metanógenas utilizan como sustrato el acetato, H_2 y el CO_2 .

Entre ambas etapas existe un grupo de bacterias llamadas **acetogénicas**, productoras del sustrato que metabolizan las metanogénicas, las bacterias acetogénicas pueden asimilar los productos finales de la etapa acidogénica por dos rutas. Primero por deshidrogenación acetogénica, donde las bacterias fermentativas acidogénicas generan los Ácidos Grasos Volátiles (AGV) y el acetato. Las especies más dominantes de esta ruta metabólica corresponden a los géneros *Syntrophomonas* y *Syntrophobacter*. La segunda ruta metabólica de las bacterias **acetogénicas** se realiza mediante la hidrogenación acetogénica. Las bacterias encargadas de esta etapa se denominan **homoacetogénicas**, utilizan el H_2 y el CO_2 para obtener acetato. Está también un grupo de bacterias denominadas **homoacetogénicas** que sintetiza el acetato a partir de H_2 y el CO_2 . (Maestrojuan, 1987). Quedando el proceso de digestión anaerobia de la FORSU y la glicerina en cuatro fases sucesivas: **hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis**.

En este estudio la caracterización microbiana se realizará mediante la técnica **FISH**, hibridación molecular *in situ*. Realiza el seguimiento y cuantificación de los microorganismos en la digestión anaerobia. Esta técnica ha sido empleada en varios estudios previo dentro del Grupo de Investigación, y ha permitido establecer correlaciones entre las poblaciones microbianas y el funcionamiento de los reactores anaeróbicos (Solera, 1999; Solera et al., 2001^a, 2001b, 2001d; Zahedi et al., 2008^a, 2008b; Zahedi, 2009; Montero, 2006; Montero et al., 2008, 2009, 2010; Pasadas, 2011).

3. OBJETIVOS

Los Objetivos del presente trabajo son:

- Determinar si la adición de glicerina a la digestión anaerobia de la FORSU mejora el proceso en relación con la producción de metano y la calidad del digerido.
- Comparar las poblaciones microbianas en la digestión anaerobia de FORSU con y sin glicerina.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Plan de trabajo

El plan de trabajo se abordó por fases.

Fase 1: Obtención de inóculo.

Para el desarrollo de los ensayos de biodegradabilidad se ha empleado inóculo procedente de un reactor monoetapa termofílico del Grupo de Investigación de Tecnologías del Medio Ambiente. El reactor, alimentado diariamente con FORSU, opera en régimen semicontinuo. Diariamente se recogía efluente hasta disponer la cantidad necesaria para los ensayos en discontinuo (10 litros). Para la caracterización del inóculo se determinaron los siguientes parámetros: pH, DQO_{total y soluble} (demanda química orgánica), ST (sólidos totales), SV (sólidos volátiles) y alcalinidad.

Fase 2: Puesta en marcha de la batería de reactores para el estudio en discontinuo.

La batería consta de 12 unidades tal como se describe en el apartado 4.5. Equipos utilizados, en el sub-apartado 4.5.1. de la presente memoria.

En la puesta en marcha del sistema y realización de las primeras pruebas se originaron una serie de problemas que hubo que solventar. Los primeros estuvieron relacionados con el sistema de contador de biogás mediante desplazamiento de aceite que posee el equipo. Se introducía el aceite en la bolsa de almacenamiento de biogás con la consiguiente contaminación de éste e inutilización de la bolsa; otros reactores presentaron problemas por circulación del aceite en sentido contrario, o bien por no retornar éste a su nivel basal una vez se alcanzaba el nivel máximo del biogás (1ml) de forma que el sistema cuantificaba erróneamente una producción continua de metano.

Además, en algunos reactores fue dificultoso el mantenimiento de las revoluciones de agitación y de la temperatura de operación seleccionada. También se encontraron dificultades para la programación analítica en continuo de la producción de biogás y las tablas de datos no estaban sincronizadas con el ordenador.

Fase 3: Estudio en discontinuo. Ensayos de biodegradabilidad. Caracterización fisicoquímica y microbiológica.

Se ensayaron 2 condiciones: adición de glicerina al 0,5% y 1% al proceso de biometanización de la FORSU. La biodegradabilidad en estos casos se compara con el proceso sin glicerina. La caracterización fisicoquímica y microbiana se explica en el apartado 5. Resultados y discusión. El contenido de los reactores es:

Reactores 1,2 y 3: 100% de inóculo a un pH de 7,50.

Reactores 4,5 y 6: 40% De inóculo y FORSU al 30% a un pH medio inicial de 7,41.

Reactores 7, 8 y 9: 40% inóculo, 30% FORSU y 0,5% de glicerina con un pH inicial medio de 7,43.

Reactores 10,11 y 12: 40% inóculo, FORSU al 30% y 1% glicerina; pH inicial medio de 7,50.

Cada reactor está por triplicado para poder tener mayor representatividad de los datos y comprobar la coherencia de los resultados con las muestras del estudio.

Para desarrollar el seguimiento del ensayo de biodegradabilidad metanogénica se realiza al comienzo del estudio una toma de muestra de cada uno de los reactores de 100 ml de volumen, excepto en el R1, R2 y R3, para analizar los parámetros iniciales de los reactores: ST, SVT, AGV, DQOs, DQOt, amonio, nitrógeno total, nitrógeno soluble, alcalinidad, pH, COT y cuantificación microbiana mediante hibridación molecular de Eubacterias acidogénicas y acetogénicas y *Archaeae* totales, utilizadoras de hidrógeno y acetoclásticas. Todos los análisis son realizados al inicio y al final del ensayo, con el fin de poder comparar los parámetros a su comienzo y su fin.

Pero el seguimiento no sólo se basa en el inicio y el final. Semanalmente se tomaron para el control de los parámetros: ST, SVT, AGV, DQOs, DQOt y COT y ver la

evolución de cómo la materia va degradándose en el interior de los reactores y si el proceso está dándose favorablemente.

El seguimiento más continuo es la determinación del volumen y composición de biogás, y la medida del pH, estos análisis se realizaron diariamente, para logramos controlar la producción y cantidad de metano en el proceso. A la hora de tomar el pH se ha buscado un valor alcalino óptimo para la creación del metano, 7-8.5, por ello se ha ajustado el pH, corrigiéndolo con Hidróxido de Sodio (NaOH), siempre y cuando ha estado por debajo de 7. Esto es debido a que el proceso se inhibe llegando a producir la apoptosis de las Arqueas metanogénicas, las cuales son muy importantes en el estudio.

Para la caracterización microbiana se ha hecho uso de la técnica analítica FISH para realizar una cuantificación ponderada de la población microbiana. Dependiendo del co-sustrato añadido al reactor y de las condiciones establecidas en el proceso, los microorganismos cambiarán en función de las condiciones ensayas, por lo que serán diferentes al inicio y al final del proceso y si contienen glicerina o no.

Todos los resultados de las técnicas y parámetros planteados en la investigación se detallan en el apartado 4.2.

4.2. Técnicas analíticas

A la hora de analizar el pH, ST y SVT no es necesario pretratar la muestra, pero sí para el desarrollo de las demás técnicas, como DQO soluble o total, AGV, nitrógeno amoniacal, nitrógeno total y soluble, alcalinidad, COT y para la cuantificación microbiana. Para esta última se realiza también una conservación de la muestra en etanol.

El *pre-tratamiento* de la muestra se procede por *lixiviación* y *filtración* dependiendo de la técnica análisis posterior. Para el caso del estudio de la DQO total y del amonio, la muestra es lixiviada. La *lixiviación* se realiza pesando 10 gr de muestra diluida en 100 ml de agua Mili-Ro en un vaso precipitado de 250 ml, luego la mezcla es agitada para homogenizar durante 50 minutos. Se deja decantar la muestra durante 10 minutos y se toma una muestra de la superficie de la dilución para evitar tomar sólidos. Esta muestra es utilizada para el análisis del amonio, nitrógeno total y DQOt.

La misma muestra lixiviada es la utilizada para la *filtración*. Dependiendo del tamaño de poro del filtro utilizado se pueden analizar varios parámetros. Si se usa un filtro de 1 micra de tamaño de poro la muestra es empleada para analizar la alcalinidad, DQOs, nitrógeno soluble y COT. Para el estudio de los AGV se usa un filtro de 0.22 micras, ya que posteriormente se analiza en el Cromatógrafo para muestra líquida.

Por último es necesario de un pretratamiento de la muestra para poder estudiar su microbiología más tarde. Se realiza pesando con exactitud 10 g de muestra, ya que se adiciona 10 ml de etanol absoluto para los 10 g de muestra, es decir, un 1 g de muestra para un 1 ml de etanol absoluto. (Figura 4.1.).



Figura 4.1: a) filtración; b) pH; c) Estufa; d) Mufla.

4.2.1. Caracterización físico-química

4.2.1.1. pH

El pH se mide de manera potenciométrica de forma directa conforme al método normalizado 4500-H+ de la APHA-AWWA-WPFC, 1995. Una vez agitada la muestra, aconsejándose un movimiento suave, se introduce el electrodo de pH. El pH-metro usado en el proceso es el *Crison micropH 2001* de 2 cifras decimales de precisión; lo constituye un electrodo de vidrio de diafragma cerámico y sistema de referencia Ag/AgCl normalizado, complementado con una sonda de compensación automática de temperatura. El equipo tiene un sistema autocalibrante con soluciones patrón de pH 9,2; 4,0 y 2,0. Los resultados son representados en unidades de pH.

4.2.1.2. Sólidos Totales (ST) y Sólidos Volátiles Totales (SVT)

Sólidos totales (ST)

Para calcular los ST se hace uso de balanza autocalibrante *Cobos* con una precisión de 0.001g, de acuerdo con el método normalizado 2540B de la APHA-AWWA-WPFC. A priori hace falta un crisol secado y enfriado y luego tarar la balanza para obtener el peso de la muestra. Una vez anotados ambos pesos se dirige a la estufa *Indelab* a 105°C durante al menos 24 horas. Después de enfriarla en el secador de vidrio se pesa y se obtiene el total de sólidos totales que tenía la muestra menos el peso del crisol.

Sólidos volátiles (SV)

La medición se realizó mediante el método normalizado de 2540E de la EPA-AWWA-WPFC, haciendo uso de la técnica anterior gravimétrica usando la misma balanza de precisión autocalibrante *Cobos*, con una exactitud que difiere en un 0,001 g. La medición se realiza en el mismo crisol anterior, pero para conseguir analizar los SV se introduce el crisol a un horno mufla ELFL4 de CARBOLITE a 550°C durante 2 horas para incinerar la muestra y conseguir los SV. El horno mufla usado es. La disminución que presenta el crisol una vez enfriado tras su incineración es la cantidad de SVT, siendo esta la diferencia del peso de los ST. Los resultados de ambos sólidos se expresan en ST o SV g/g de muestra húmeda.

4.2.1.3. Demanda Química de Oxígeno (DQO)

La determinación de la DQO se ha realizado por espectrofotometría, empleando el método colorimétrico normalizado 5220-C de la APHA-AWWA-WPFC, 1995. En el proceso se ha estimado 2 tipos de DQO, para ambos casos se usa la misma metodología:

- 1) La DQO soluble (DQOs), analizada a partir de las muestras pre-tratadas mediante lixiviación y filtración.
- 2) La DQO total (DQOt) es determinada a partir de la muestra sólo lixiviada.

Para su medición se emplea la espectrofotometría de absorción a una longitud de onda de 585 nm que mide el dicromato reducido a Cr³⁺. Éste es reducido porque ha oxidado la materia orgánica presente en la muestra y su absorbancia es el resultado de la transmitancia del analito y del haz de luz que traspasa la muestra.

La calibración del método se determina por mínimos cuadrados, sacados de la correlación lineal establecida entre los valores de DQO teóricos relativos a soluciones patrones preparados con glucosa y sus correspondientes valores de absorbancia a 585nm al espectrofotómetro UV-Visible usado es el THERMO SCIENTIFIC, serie GENESYS.



Figura 4.2. Espectrofotómetro.



Figura 4.3. Medidor de Alcalinidad.



Figura 4.4. Destilador.

4.2.1.4. Alcalinidad

Su determinación se realiza mediante una técnica volumétrica de valoración potenciométrica y se lleva a cabo en un equipo Crison Compact Titrator S+. La muestra una vez lixiviada y filtrada se diluye en agua Mili-Ro, en una dilución 1:5 e inmediatamente titulada con ácido sulfúrico 0.2 N hasta pH 4.3. (Jenkins et al. 1983).

La dilución de la muestra y el agua destilada se incorpora en un vaso precipitado de 100 ml de capacidad, el cual se sitúa en el analizador y se realiza automáticamente la valoración de la muestra, permitiendo el punto de inflexión final de titulación. Los resultados se expresan en mg CaCO_3 / L. Figura 4.3.

4.2.1.5. Nitrógeno amoniacal (NH_4) y Nitrógeno Total Kjeldahl (NTK)

Para la determinación del amonio se hace uso de la técnica volumétrica de retrovaloración con ácido sulfúrico 0.02 N del destilado de una muestra tamponada con tampón borato. El método usado es el 4500-NH₃-E de la APHA-AWWA-WPFC, 1995, por el que el nitrógeno amoniacal se recoge mediante destilación sobre un ácido bórico que es retrovalorado con ácido sulfúrico. Destilador figura 4.4.

El equipo usado es Buchi Selecta Pronitro II, que permite la realización de la destilación del amonio que se ha liberado en el tratamiento del ácido, su recogida se realiza sobre una disolución de ácido bórico de forma automática por el equipo.

Después a la destilación, la cantidad de amonio se determina con H_2SO_4 estándar y un indicador mixto, para luego ser medido en el equipo de la alcalinidad.

La determinación del nitrógeno total se realiza a partir del método Kjeldhal de la APHA-AWWA-WPFC, 1995.

4.2.1.6. Ácidos Grasos Volátiles (AGV)

Para poder analizar los AGV es necesario haber pre-tratado la muestra mediante lixiviación, filtrado y conservándola con ácido fosfórico en el congelador a menos $20^{\circ}C$, si no se ha conservar no sería necesario añadir 2 gotas de ácido fosfórico. Después es de nuevo filtrada por filtros Millipore GVWP025000 de $0.22\ \mu m$ (Figura 4.5. Filtro AGV), ya que el equipo encargado de analizar los 9 AGV requiere ese diámetro de partícula, se les añade en cada 1ml de muestra, 0.4 ml de ácido fosfórico y 0.5 de ácido sulfático. El equipo empleado es un Cromatógrafo de gases Shimadzu GC-2010 compuesto por un inyector Shimadzu AOC-20i y de un detector de ionización de llama (FID).

Los analitos determinados en el Cromatógrafo en la tabla 4.1:

acético (C2)	butírico (C4)	. isocaproico (iC6)
propiónico (C3)	isovalérico (iC5)	caproico (C6)
isobutírico (iC4)	valérico (C5)	heptanoíco (C7)

Tabla 4.1.: Analitos determinados en el Cromatógrafo.

4.2.1.7. Volumen y Composición del biogás

El volumen producido por los reactores es almacenado en unas bolsas de muestreo de 5l fabricadas por Tedlar. Las bolsas Tedlar disponen de una conexión con válvula y un septum que permite tomar la muestra de gases, mediante una jeringa para gases Dynatech Gastight de 1ml. Figura 4.6.

La cuantificación del volumen en la bolsa se realiza mediante dos aparatos de extracción del gas, los cuales son:

- ❖ Bomba de succión de gases Laboport KNF (KT-18) con una capacidad de 5.5 l/min en condiciones estándar de presión y temperatura.
- ❖ Flujómetro de gases de precisión Ritter TG-1 tipo tambor rotatorio sumergido en aceite sintético Rixol-III con error máximo del 0.2%. Este equipo lleva incorporado un termómetro y un manómetro de aceite para poder realizar la compensación de volumen debida a las diferentes condiciones de temperatura y presión de las muestras. Figura 4.7.



Figura 4.5. Filtro AGV



Figura 4.6. Bolsa Tedlar



Figura 4.7. Bomba gases

Para determinar la composición del biogás se usa el Cromatógrafo de gases, Shimadzu GC-2010 conectado a un PC, contiene 2 detectores que nos detallan los porcentajes de cada gas, excepto el H_2S que viene expresa en unidades de ppm, ya que su concentración es mínima en la totalidad del biogás. El equipo cromatográfico viene detallado en la sección de 5.2.3. Equipos utilizados, apartado 5.2.3.3. Cromatógrafo de gases.

4.2.2. Caracterización microbiológica

Los microorganismos anaerobios son muy diversos y presentan unas interacciones microbianas y unas funciones metabólicas que actualmente no se conocen en detalle (Talbot et al., 2008). Para su estudio analítico se utilizará la técnica microbiológica de microscopía de epifluorescencia mediante FISH. La técnica microbiana necesita un tratamiento previo compuesto por dos fases: conservación y luego para realizar su conteo se realiza un pretratamiento. La conservación ayuda a evitar cualquier modificación de los microorganismos, cambio en el número, forma, tamaño de las células. La conservación de la muestra se desarrolla en una dilución 1:1; 10 g de muestra en 10 ml de etanol absoluto en un frasco estéril, de esta manera, pueden durar hasta dos meses. La fase de pretratamiento óptimo elegida consiste en añadir 40µl de un

agente tensioactivo, Tween 80 (5µg/µl) en 18 ml de tampón fosfato, junto con 2 ml de muestra bien agitada durante 2 minutos. (Zahedy, 2013).

4.2.2.1. Microscopía de epifluorescencia mediante FISH

FISH, permite identificar y cuantificar los principales grupos microbianos responsables de la digestión anaerobia. El objetivo de la técnica se basa en las características moleculares propias del ARNr de los microorganismos estudiados y por lo tanto, permite el estudio de los diferentes grupos microbianos, a diversos niveles de especificidad (Kampmann et al., 2012).

Para su desarrollo se usa unas sondas de oligonucleótidos de cadenas simples de ácidos nucleicos químicamente sintetizadas, que tiene una media de longitud de entre 15 a 30 nucleótidos por sonda. La unión se produce en el extremo covalente 5' con un alto rango de agentes como son: biotina, digoxigenina, enzimas y marcajes fluorescentes, que permiten la identificación microscópica directa de células simples (Montero, 2006). Normalmente, las sondas son marcadas con marcajes fluorescentes, tales como la fluoresceína o indocarbocianina (Amann et al., 2001; Hugenholtz et al., 2001). Gracias al pequeño tamaño de las sondas pueden adentrarse en las células completas fijadas y sólo formar híbridos estables con la secuencia diana de ARN ribosómico (Montero, 2006). Estos ribosomas se consideran sitios diana, ya que la sonda se hibrida a las células, proporcionando una gran sensibilidad a la técnica fluorescente y se facilita la identificación celular, (Amann et al., 1990).

La técnica FISH se realiza en varias etapas: permeabilización y fijación, hibridación, lavado y, finalmente, su visualización que se realiza en el mismo microscopio (Montero, 2006). Resaltar que para las bacterias de la familia *Methanobacteriaceae*, metanógenas utilizadoras de hidrógeno, necesitan una fase extra antes de añadir la solución de hibridación, se denomina: ciclos de congelación/descongelación. Esta fase se compone de 5 ciclos de congelación/descongelación (Sekiguchi et al., 1999). El objetivo de la fase es debilitar la membrana de la célula para que pueda entrar la sonda MB1174. Las sondas de nucleótidos usadas corresponden a una concentración de formamida desionizada (FA) del 20 y 30%, incubadas durante una hora y media a 46°C de temperatura, logrando sondas que a su vez se enlazan con las secuencias diana de las bacterias y arqueas. (Figura 4.9. Batería de baño de deshidratación).



Figura 4.8. Fijación FISH



Figura 4.9. Batería de baño de deshidratación

4.3. Equipos utilizados

4.3.1. Sistema semiautomático de ensayos de biodegradabilidad anaerobia de 12 posiciones.

El equipo suministrado por Demédenes, S.L., consta de 12 unidades de acero inoxidable de dos litros de capacidad, que se complementa con una línea de acondicionamiento y medidor de caudal de biogás y con dos equipos acoplados para la determinación de biogás. La cuantificación de CH_4 , O_2 , CO_2 y SH_2 se realizan mediante el analizador de gases 3000 PLUS de Geotech y H_2 mediante un sistema de conductividad térmica (equipo 8866) de ADEV (Figura 4.10.)



Figura 4.10. Sistema semiautomático de ensayos de biodegradabilidad anaerobia.

La instalación está compuesta por los siguientes elementos:

Alimentación y consumo:

Se basa en dos sistemas de alimentación independientes:

- Alimentación 1 (sistema de calentamiento de los reactores): 230VAC; 11^a
- Alimentación 2 (resto de componentes): 230 VAC, 4C

12 Reactores tipo vasija de acero inoxidable:

Cada reactor está determinado por las siguientes características:

- ✓ -Son de acero inoxidable 304, de 2 l, en el ensayo sólo se ocupará 1.7 l. Pero se quitan 100 ml para su análisis inicial, excepto en los reactores 1, 2 y 3, por lo que el volumen total de todos los reactores es de 1.6 l.
- ✓ -Están dotados de un sistema de control de velocidad de agitación, con velocidad máxima de 100 rpm. En los experimentos la velocidad homogenizar la muestra fue de 23 rpm.
- ✓ -El control de la temperatura en el interior del reactor está garantizado gracias a la camisa calefactora de 500W y con un sistema termopar tipo T, temperatura máxima de 80° C. Con rango termofílico a 55°C, para así llevar el ensayo a su máxima eficiencia. Además de la camisa calefactora está dotado un sistema de aislamiento mediante una camisa de tela de silicona.
- ✓ -El cierre del reactor es asegurado por una abrazadera de tipo Clamp y una junta polimérica de EPDM.
- ✓ -La tapa contiene 5 conexiones, para distintos usos, pero la única salida empleada es la salida a la bolsa de acumulación de biogás, ésta es de 1/4" libre.
- ✓ -En la base del reactor está acoplada una pieza de apoyo fabricada de Nylon y de un plato de soporte de reactor, con nuez para varilla de 12 mm.
- ✓ -Por último lleva instalado una nuez doble para la sujeción de un bastidor principal.

Línea de acondicionamiento y medida de caudal de biogás.

Se compone de:

- Sistema de condensación de vapor de agua mediante célula Peltier.
- Filtro de coalescencia compuesto por vaso de vidrio con tapón de vacío y lana de vidrio de porosidad 7.
- 12 Gas Counter 100v0, equipos para medición de caudal por desplazamiento de líquido desarrollados por Demede Engineering & Research. Rango de caudal 1-1800 ml/h. Incluyen filtro de coalescencia.
- Tubo de 1/8" de PFA.

Sistema de analizador de gases.

- Equipo GA 3000 PLUS del fabricante Geotech. Permite analizar los siguientes gases:
 - CH₄ en un rango de 0-100% mediante célula por infrarrojo.
 - CO₂ en un rango 0-100% mediante célula por infrarrojo.
 - O₂ en un rango 0-25% mediante célula electroquímica.
 - H₂S en un rango 0-1% mediante célula electroquímica.
 - CO en un rango 0-1000 ppm mediante célula electroquímica.

Sistema analizador de hidrógeno.

- Equipo 8856 del fabricante ADEV. Permite analizar H₂ en un rango de 0-100% mediante medida de conductividad térmica (TCD). Incluyen sistema de compensación de efectos cruzados para 2 señales.

Instrumentación y sistema de control.

- PLC de pantalla táctil de 10.4" integrado en cuadro de control. Incluyen interruptor diferencial de 40^a e interruptor magneto térmico de 25^a.
- Sistema de conmutación de líneas de proceso mediante 13 electroválvulas de 24 VDC.

Bastidor autoportante y accesorios.

- Bastidor fabricado en tubo cuadrado de 30x30x1.5 mm de acero inoxidable. El conjunto está formado por dos estructuras que soportan 6 reactores cada una. A su vez cada una de ellas es desmontable en marco principal de 2 pies con ruedas y sistema de regulación de altura. Incluyen nueces para varilla redonda de 12 mm y soporte para base del reactor.
- Sistema de alimentación ininterrumpida (SAI) de 2000 VA, 50W para 8 horas de duración.
- La instalación incluyen fuentes de alimentación, conectores, racordaje y otros elementos accesorios para el correcto funcionamiento de la misma.

4.3.2. Cromatógrafo de gases.

El equipo utiliza una columna de fase de Nukol (politilenglicol modificado con ácido nitrotereftálico) de 30 metros de longitud, 25 mm de diámetro interno y 25 μm de película, que separa los componentes de la muestra según su fuerza ácida. El hidrógeno es utilizado como gas portador, mientras que el nitrógeno es usado como gas de fondo para transportar la muestra por el recorrido del Cromatógrafo.

Las características del método cromatográfico de gases son las siguientes:

1. Inyección automática de 1 μl de muestra a 250°C con *Split* 1:25 y purga de 5 ml/min.
2. El gas portador utilizado es el hidrógeno (42,1 ml/min y 75,5 kPa), que en las condiciones de purga y Split empleadas en los análisis supone una velocidad lineal de 45 cm/s, y un flujo en columna de 1,43 ml/min. La llama se genera a partir del aire sintético (400 ml/min y 50 kPa) e hidrógeno (40 ml/min y 60 kPa).
3. Programación de temperaturas en el horno:
 - Temperatura inicial de 115°C durante 0.5 minutos.
 - Rampa de temperatura de 30 °C/ minuto hasta alcanzar 150°C.
 - Rampa de temperatura 15°C/minuto hasta alcanzar 180°C.
 - Temperatura constante (180°C) durante 4 minutos.
4. Patrón interno de fenol de concentración conocida (entre 500-600 mg/l), que se incluye en todas las muestras inyectadas a la misma concentración.



Figura 4.5.2. Cromatógrafo de gases.

4.3.3. Cromatógrafo líquido

El Cromatógrafo empleado es un Shimadzu GC-2010, y posee por 2 detectores:

- 1- Detector de Conductividad Térmica (TCD) emplea una columna Supelco Carboxen 1010 Plot. Analiza los gases: H₂, O₂, CH₄ y CO₂.
- 2- Detector Fotométrico de Llama (FPD) utiliza una columna Supelco Supel-Q Plot para determinar H₂S.

El equipo contiene un *splitter* que divide la muestra gaseosa en 2 canales, éste se encuentra colocado entre el puerto de inyección y las columnas que hemos mencionado anteriormente; permitiendo la cuantificación de todos los compuestos posteriores en una misma inyección de biogás.

Shimadzu GC-2010 está compuesto por:

- ✓ Puerto de inyección.
- ✓ Splitter o divisor de caudales, el cual divide la muestra de biogás en 2, a posteriori el gas portador, Helio, transporta la muestra hasta su detector.
- ✓ Columna Carboxen 1010 Plot (Supelco) de 30 m de longitud y 0.53 mm de diámetro interno.
- ✓ Columna Supel-Q Plot (Supelco) de 30 m de longitud y 0.32 mm de diámetro interno.
- ✓ Un TCD que opera a 250°C para la determinación de H₂, O₂, CH₄ y CO₂.
- ✓ Un FPD que opera a 250°C para el análisis del H₂S.
- ✓ Helio como gas portador y además como se utiliza como gas auxiliar de fondo.
- ✓ Aire sintético e hidrógeno para generar la llama.

4.3.4. Analizador de Carbono Orgánico Total.

Se trata de una combustión catalítica a 680°C que consigue oxidar la muestra, descomponiendo los compuestos orgánicos, incluyendo los compuestos insolubles y los compuestos orgánicos macromoleculares. Para dar comienzo a la oxidación de la materia, se desarrolla una combustión que necesita un ambiente rico en oxígeno, para ello, el equipo esta alimentado de aire sintético, el cual tiene una gran concentración en oxígeno.

El producto de la combustión es CO_2 , detectado mediante un analizador de gases infrarrojo (NDIR, detector de infrarrojo no dispersivo). Se usa para determinar la absorbancia del gas. Cada detección es limitada con 4 $\mu\text{g/l}$ de muestra, siendo el nivel más alto para el análisis del método de oxidación catalítica de combustión. El equipo se encarga de realizar las gráficas y obtener a partir de las absorbancias la concentración de COT. Finalmente la concentración de COT es calculada por la resta de la concentración de carbono inorgánico a la concentración de COT.



Figura 4.5.4. Analizador COT

El equipo utilizado es el, TOC-L, TOTAL ORGANIC CARBON ANALYZER, Shimadzu. Corp. H544251.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se exponen y discuten los resultados más relevantes del estudio llevado a cabo sobre la biodegradabilidad metanogénica termofílica de biorresiduos y glicerina. Además se realiza una comparación de las condiciones del proceso y se determina cuál de ellas es la más efectiva para la producción de metano, junto con una comparación de la población microbiana en cada condición estudiada al inicio y al final del ensayo.

El ensayo metanogénico ha tenido una duración total de 22 días. El seguimiento y control del proceso se ha realizado mediante la evolución de los parámetros físico-químicos y la generación de metano a lo largo del ensayo. El análisis microbiológico muestra la composición de las principales poblaciones microbianas tanto al comienzo como al final del estudio en cada una de las condiciones ensayadas.

Si bien conviene señalar que, de la partida inicial de reactores considerados en el estudio, se han presentado una serie de problemas en alguno de ellos por lo que no se

han considerado en este apartado de resultados y discusión. Los reactores y los problemas surgidos fueron:

- Reactor n° 3 (100% Inóculo): se produjo una contaminación de aceite dentro de la bolsa de almacenamiento de biogás, causando una alteración en la composición del gas generado.
- Reactor n° 5 (40% Inóculo + 30% FORSU), Reactor n° 8 (40% Inóculo + 30% FORSU + 0.5 % Glicerina) y Reactor n° 10 (40% Inóculo + 30% FORSU + 1% Glicerina): presentaron irregularidades en la generación de metano y evoluciones muy diferentes con respecto a sus réplicas.

En las tablas 5.1. y 5.2. se presentan los valores de los parámetros físico-químicos de los elementos para la caracterización del residuo (FORSU) y del subproducto (glicerina).

Tabla 5.1. Caracterización del residuo (FORSU).

Parámetros	Unidades	Valor medio
Sólidos Volátiles Totales (SVT)	g/kg	275±15
Humedad	%	42±4
Demanda Química de Oxígeno Total (DQO _T)	g O ₂ /kg	191±29
Ácidos Grasos Volátiles	g acético/l	8±1
pH	-	5.73±0.3 ^a
Microorganismos ^b	10 ⁷ células/ml	85±10 ^a

^a Caracterización correspondiente a la alimentación (20% en sólidos) ^b Determinados por Hibridación Molecular *in situ* (FISH)

Tabla 5.2. Caracterización del subproducto (glicerina).

Parámetros	Unidades*	Valor medio
H ₂ O	%	13±1
Demanda Química de Oxígeno Total (DQO _T)	g O ₂ /kg	273±32
Ácidos Grasos Volátiles	g acético/l	0.034±0.008
pH	-	5.3±0.1

El aporte principal de SV a la alimentación procede de la FORSU (tabla 5.1. y 5.2.). La glicerina se caracteriza por un aporte importante en materia orgánica disuelta y principalmente carbonada. Tanto la FORSU como la glicerina presentan valores de pH ácido. La FORSU contiene un elevado número de microorganismos, consecuencia del comienzo de degradación de la misma durante la recogida y transporte a la planta y el tiempo de almacenamiento en ésta. La glicerina complementa muy bien a la FORSU en materia orgánica, por lo que en principio hace pensar que su adición favorecería el proceso de la digestión anaerobia.

Los valores medios (v.m.) y sus desviaciones (dsv) obtenidos en la caracterización físico-química de los sustratos e inóculo empleados en el estudio se presenta en la tabla 5.3. Se observa que el pH del inóculo es casi neutro en comparación con los sustratos que presentan un pH más ácido; además los sustratos, FORSU y glicerina, contienen mayor cantidad de materia orgánica (DQOs, DQOt, COTs) y de ST presentes en la muestra húmeda. La composición de carbono (COTs) es superior en la FORSU y en la glicerina, siendo casi 5 veces mayor que la del inóculo y la alimentación. La glicerina es una sustancia muy carbonatada y acidificante. La estabilidad del nitrógeno es un dato favorable para llegar a cabo la metanogénesis, ya que no se genera amonio en el sistema que sería inhibitorio.

Tabla 5.3.: Parámetros físico-químico de las muestras utilizadas al comienzo del ensayo.

	pH	DQO soluble (g O ₂ /l)		DQO total (g O ₂ /l)		COT soluble (g/l)		Nitrógeno soluble (g/l)		ST(g ST/g Muestra Húmeda)		Alcalinidad (g CaCO ₃ /l)	
	inicial	v.m.	dsv	v.m.	dsv	v.m.	dsv	v.m.	dsv	v.m.	dsv	v.m.	dsv
Inóculo	7,5	20,29	1,31	42,68	1,31	4,50	0,17	1,39	0,03	0,03	0,00	5,64	0
FORSU	5,73	174,87	5,96	261,82	4,42	24,02	0	0,92	0,00	0,57	0,00	4,16	0
Alimentación	5,73	31,59	0,44	50,55	2,76	8,18	0	1,94	0,00	0,15	0,01	1,41	0
Glicerina	5,45	269,97	0	NA	NA	29,58	0	0,38	0,00	0,87	0,00	288,00	0

En la Tabla 5.4. se presenta los valores medios y desviaciones de los parámetros físico-químicos determinados al principio y final del ensayo.

Tabla 5.4.: pH y la Alcalinidad.

	pH				Alcalinidad (g CaCO ₃ /l)			
	Inicio		Final		Inicio		Final	
	v.m.	dsv	v.m.	dsv	v.m.	dsv	v.m.	dsv
IA	7,42	0,05	8,38	0,05	3,16	0,01	14,33	0,12
IAG*	7,39	0,00	8,23	0,00	3,21	0,05	16,55	3,03
IAG**	7,51	0,01	7,74	0,00	3,33	0,18	17,49	0,93

IA: 40% Inóculo + Alimentación (30% FORSU), IAG*: 40% Inóculo + Alimentación (30% FORSU) + 0.5%

Glicerina y IAG**: 40% Inóculo + Alimentación (30% FORSU) + 1% Glicerina.

Se observa como el pH evoluciona hacia su óptimo de producción metanogénica (7,5-8,5). El pH influye en los procesos de biodegradación, afectando a la velocidad del proceso y a la determinación del tipo de microorganismo. El efecto del pH está asociado, además de la concentración de AGV, al potencial redox y a la alcalinidad (Fernández, 2010). La alcalinidad es la capacidad para neutralizar los ácidos en el sistema, y la relación de ácidos grasos volátiles/alcalinidad se usa como una medida para evaluar la estabilidad del sistema y controlar la acumulación de AGV en los

reactores anaerobios: un valor de 0,2 indica una capacidad excelente tampón del sistema, teniendo como valor máximo 0,4 (Zahedi, 2013). Si la acidez del medio es muy alta, se inhibe el proceso digestión anaerobia, sin embargo se ha observado que si la acidez y la alcalinidad son muy altas, el proceso puede ser estable también. Los ensayos a partir del día 12 en los reactores sin glicerina han funcionado como digestores estables con una relación de AGV/Alcalinidad ($0,41 \pm 0,11$), en la condición IAG*0,5% se alcanzó la estabilidad al final del estudio ($0,49 \pm 0,16$) y en la condición IAG **1% no se alcanza.

En la Tabla 5.5. se muestran los resultados de sólidos totales y volátiles al inicio y final del ensayo en cada una de las condiciones estudiadas.

Tabla 5.5.: Sólidos Totales y de los Sólidos Volátiles.

	STg (ST/g Muestra Húmeda)				SV (g SV/g Muestra Húmeda)			
	Inicial		Final		Inicial		Final	
	v.m.	ds v	v.m.	ds v	v.m.	ds v	v.m.	ds v
IA	0,08	0,02	0,11	0,01	0,06	0,02	0,03	0,00
IAG*	0,08	0,02	0,08	0,01	0,06	0,02	0,03	0,00
IAG**	0,11	0,01	0,11	0,02	0,08	0,02	0,04	0,00

El contenido en ST y SV de las alimentaciones son similares puesto que la fuente es la FORSU, cuyo contenido es prácticamente el mismo en todas. En todos los casos estudiados, los SV disminuyen en el proceso a consecuencia del consumo de materia orgánica, quedando al final del ensayo unos ST más ricos en sólidos inorgánicos.

Los resultados medios de DQO total y soluble obtenidas en cada tipo de reactor al principio y finalización del ensayo se presentan en la tabla 5.6. Se observa, lógicamente, que las alimentaciones con glicerina tienen un mayor porcentaje de materia orgánica soluble (53%) que la alimentación con FORSU únicamente (44%) debido a la naturaleza soluble de este compuesto. Aunque el rendimiento depurativo, determinado por la reducción porcentual de la DQO total, es mayor en el caso de la alimentación con glicerina al 1%, este caso presenta la menor reducción de materia orgánica soluble (23%) lo que indica que se han realizado las primeras etapas de la degradación anaerobia en la que se solubiliza la materia orgánica pero las siguientes fases, en las que hay un consumo de esta materia orgánica para la generación de metano, se encuentran parcialmente inhibidas.

Tabla 5.6.: DQO total y soluble.

	DQO soluble (g O ₂ /l)					DQO total (g O ₂ /l)				
	Inicio		Final		R. D.	Inicio		Final		R. D.
	v.m.	dsv	v.m.	dsv	%	v.m.	dsv	v.m.	dsv	%
IA	27,74	4,49	13,39	1,66	51,73	47,33	0,11	38,54	0,11	18,57
IAG*	37,64	4,26	18,31	4,42	51,35	62,55	1,03	50,18	7,29	19,78
IAG**	44,63	5,30	31,61	8,00	29,17	59,78	35,29	40,81	47,28	31,75

*R.D.= Rendimiento depurativo de la DQO soluble y total.

En las otras condiciones estudiadas, alimentación solamente con FORSU y con FORSU y glicerina al 0,5%, la reducción de DQO soluble es similar, del 46% y 47%, respectivamente, pero la alimentación con FORSU presenta mayor reducción de DQO total.

Los valores medios de COT y de N₂ soluble registrados al comienzo y finalización del ensayo se presentan en la tabla 5.7. Se aprecia como el COT es mayor en los reactores que contienen glicerina debido a su mayor contenido en materia orgánica carbonada. La reducción de materia orgánica es mayor en la alimentación con FORSU (39%) y menor a medida que aumenta la concentración de glicerina en la alimentación (33% para el 0,5% y 22% para el 1%). Estos resultados son consecuencia de la inhibición parcial de los reactores con glicerina debido a cierta acidificación durante el ensayo. En referencia al nitrógeno soluble es importante apreciar que la concentración se ha mantenido estable desde su inicio a su fin, siendo esto muy satisfactorio para la producción de metano, ya que si genera amonio durante la digestión anaerobia puede inhibirse la metanogénesis.

Tabla 5.7.: COT y Nitrógeno Soluble.

	COT soluble (g/l)				Nitrógeno soluble (g/l)			
	Inicial		Final		Inicial		Final	
	v.m.	dsv	v.m.	dsv	v.m.	dsv	v.m.	dsv
IA	6,54	1,59	4,33	0,44	1,43	0,13	1,43	0,06
IAG*	10,60	0,18	6,18	1,82	1,53	0,13	1,50	0,01
IAG**	12,56	0,94	8,56	1,55	1,63	0,06	1,34	0,10

La concentración de los principales AGV presentes en los reactores se muestra en la Tabla 5.8., tanto al inicio como al final del ensayo. La formación de ácidos durante el proceso anaerobio es consecuencia de la solubilización de la materia orgánica en las primeras etapas del proceso, siendo los principales ácidos el acético, propiónico y butírico. En sistemas estables, sistemas no inhibidos, la acumulación de tales ácidos debe de ser escasa puesto que una vez generados son transformados y consumidos en las etapas de acetogénesis y metanogénesis, respectivamente. En estos casos los ácidos que se detectan son acético en primer lugar y butírico secundariamente. Por el contrario

en sistemas no estables o inhibidos es normal que se acumule, además de grandes cantidades de acético, propiónico, fundamentalmente.

Tabla 5.8.: Ácidos Grasos Volátiles

	Ácidos Grasos Volátiles															
	Acético (PM=60)				Propiónico (PM=74)				Butírico (PM=88)				Valérico (PM=102)			
	inicial		final		inicial		final		inicial		final		inicial		final	
	v.m.	ds v	v.m.	ds v	v.m.	ds v	v.m.	ds v	v.m.	ds v	v.m.	ds v	v.m.	ds v	v.m.	ds v
IA	37	31,82	53	8,49	25	1,41	106	27,58	21	3,15	NA	NA	1	1,34	NA	NA
IAG*	12,93	4,71	80,9	62,08	22,75	0,35	137,5	17,68	25,85	8,70	21	7,78	1,65	0,21	8,75	4,60
IAG**	18,46	2,35	227,5	65,76	21,5	0,71	241	11,31	21,82	0,07	35	11,31	1,8	0,42	42,5	36,06

Los resultados de este estudio muestran una gran acumulación de acético y propiónico en los reactores que contienen FORSU y glicerina, indicando inhibición de estos casos y corroborando los resultados previos comentados anteriormente al respecto. La inhibición es más acusada en el caso de los reactores alimentados con glicerina al 1%. Es también propio de sistemas inhibidos la detección de AGV de cadena más larga como el valérico.

La evolución de los principales AGV: acético, butírico y propiónico se presenta en la Figura 5.1. El ácido que se degrada con mayor rapidez es el butírico, siendo prácticamente nula su concentración en el final del ensayo. Por otro lado el ácido acético se degrada más lentamente, como se aprecia en la gráfica, dando una degradación no concluida al final del proceso, en especial en los reactores que contienen glicerina, debido a la inhibición ya comentada.

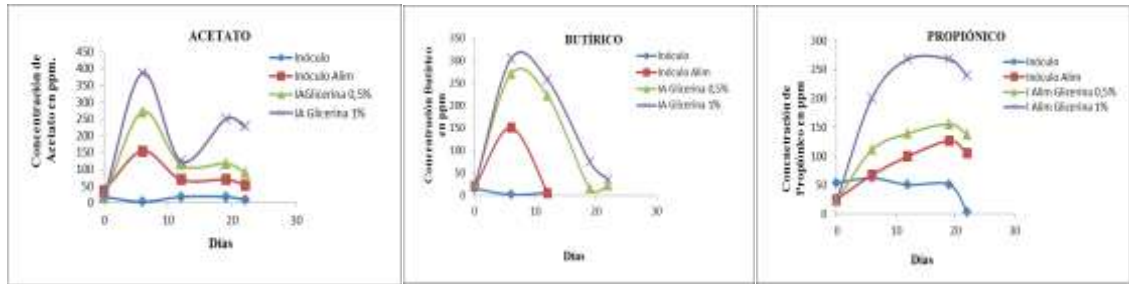


Figura 5.1. Evolución de los ácidos más destacados: acetato, propiónico y butírico.

Biogás:

El biogás generado en el presente estudio está compuesto de CH₄ y CO₂. La concentración de H₂ y H₂S ha sido nula en todos los casos.

En la Figura 5.2. se representa la evolución de metano a lo largo del estudio en cada una de las condiciones ensayadas. En la Tabla 9 siguiente se muestra las cantidades de metano acumulado medio en cada día de ensayo y el potencial de biodegradabilidad alcanzado en cada una de las alimentaciones utilizadas.

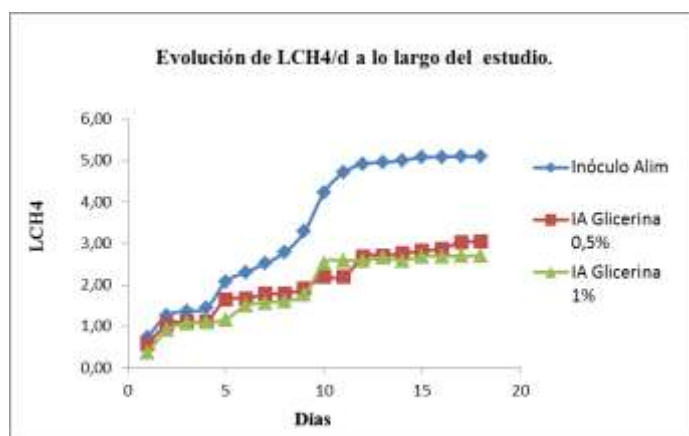


Figura 5.2: Evolución de metano acumulado.

Como se observa en la figura 5.2., se obtiene una mayor producción de metano en los reactores alimentados con FORSU únicamente. La inhibición de los reactores con glicerina explica la menor producción de biogás en estos reactores. En la Figura 5.3. se presenta la biodegradabilidad metanogénicas de cada una de las alimentaciones utilizadas calculadas como LCH4 acumulado por g de DQO total inicial.

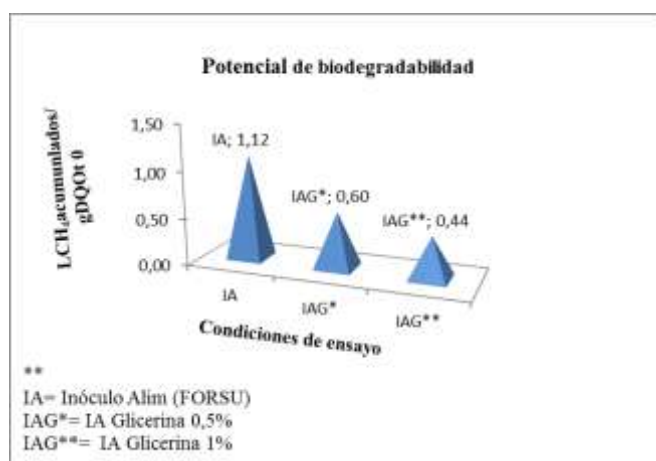


Figura 5.3: Potencial de biodegradabilidad de las diferentes condiciones de estudio.

Como puede observarse en la figura 5.3., la alimentación que contiene únicamente FORSU presenta una biodegradabilidad superior en un 46,43% y 60,72% a las que contienen glicerina en un 0,5% y 1%, respectivamente. Estos resultados concuerdan con

los anteriores y muestran que la adición de glicerina a la DA de FORSU no favorece el proceso.

Caracterización microbiológica:

Para cuantificar la población microbiana se ha utilizado la técnica de hibridación molecular in situ (FISH), usando diferentes sondas para las principales poblaciones de microorganismos: *Eubacteria* y *Archaea*, y las subpoblaciones de ésta (arqueas utilizadoras de acetato y arqueas utilizadoras de hidrógeno). La población total se ha estimado mediante la suma de la concentración de *Eubacteria* y *Archaea* ya que son los grupos mayoritarios en los digestores anaerobios. En la Tabla 5.9. que representa los la concentración total de microorganismos y los porcentajes relativos de los principales grupos en los digestores al principio y final del ensayo en discontinuo.

Tabla 5.9.: Cuantificación de Eubacterias y Arqueas.

	Biometanización termofílica	Población total FISH (10^7 cel/ml)	% eubacterias	%archaea		
				%M.U.A.	%M.U.H.	%Total
I	Inicial	288,3	97	1,1	1,9	3
	Final	231,4	97,1	0,8	2,1	2,9
IA	Inicial	224,9	97,3	1,1	1,6	2,7
	Final	234,6	96,6	0,6	2,7	3,4
IAG*	Inicial	224,9	97,3	1,1	1,6	2,7
	Final	222,6	96,6	0,6	2,9	3,4
IAG**	Inicial	264,9	97,4	1,1	1,4	2,6
	Final	337,5	98	0,8	1,2	2

*% M.U.A=Metanógenas Utilizadoras de Acetato. **%M.U.H.=Metanógenas Utilizadoras de Hidrógeno.

Se observa que el microorganismo que más abunda en el estudio son las Eubacterias, superando el 97% del total en todas las condiciones de ensayo. Las *Archaea* son el dominio minoritario en el estudio y están representadas por las metanogénicas utilizadoras de acetato y de hidrógeno, estas últimas son las más abundantes dentro del dominio de las *Archaea*. Estas proporciones de los grupos mayoritarios son consecuencia del inóculo utilizado en el estudio. En este caso el aporte de materia orgánica soluble de la glicerina conlleva un incremento de la población de Eubacterias, fundamentalmente, que se encargan de las primeras etapas de la degradación, incluida la de acetogénesis (en estos digestores se observan las mayores acumulaciones de acético), por lo que al final del ensayo la población de microorganismos presenta un ligero enriquecimiento de Eubacterias ya que las metanógenas se encuentran parcialmente inhibidas.

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones del presente trabajo son:

- La adición de glicerina a la digestión anaerobia de la FORSU no mejora el proceso en la producción de metano ni en la calidad del digerido.
- La comparación entre las poblaciones microbianas en la digestión anaerobia de la FORSU con y sin glicerina confirma que las bacterias mayoritarias en ambos ensayos es la población de Eubacterias; pero en los reactores con glicerina se observa una inhibición de las *Archeas*, por lo que no se genera el metano.

CONCLUSIONS

The most relevant facts are:

- The addition of glycerin in the anaerobic digestion of the FORSU doesn't improve the process in the production of methane neither in the quality of the digested.
- The comparison between microbial populations in the anaerobic digestion of the FORSU with and without glycerin confirms that the most abundant population of bacteria were the Eubacteria; but we could observe an inhibition of the *Archea* in the reactors with glycerin so no methane was generated.

7. BIBLIOGRAFÍA

-APHA, AWWWA, WPCF. "Standard methods for the examination of water and wastewater" American Public Health Association. Washington, D.C 17 th ed. (1989).

-Solera, R. (1999). "Cuantificación de los microorganismos responsables de la degradación anaerobia. Aplicación al análisis del funcionamiento de reactores anaerobios". Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz.

-Solera, R.; Romero, L.I.; Sales, D. (2001a). "Determination of the Microbial Population in Thermophilic Anaerobic Reactor: Comparative Analysis by Different Counting Methods". *Anaerobic*, v.7, p. 79-87.

- Solera, R.; Romero, L.I.; Sales, D. (2001b). "Digestión Anaerobia termofílica de vinazas. Determinación de la biomasa por microscopía de epifluorescencia". *Tecnoambiente*, v. 113, p.25-29.
- Montero, B. (2006). "Desarrollo de las técnicas microbiológicas para el seguimiento de la dinámica de los principales grupos bacterianos implicados en el proceso anaerobio termofílico para el tratamiento de residuos con alto contenido en sólidos". Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz.
- Conrad, R., Klose, M., (199). "Anaerobic conversion of carbon dioxide to methane, acetate and propionate on washed rice roots". *FEMS Microbiology Ecology*, v.30, p. 147-155.
- Forster Carneiro, T; Pérez, M.; Romero, I.I. (2008). Thermophilic anaerobic digestion of source-sorted organic fraction of municipal solid waste. *Bioresource Technology*, 99, 6763-6770.
- García, J.L. (1990). "Taxonomy and ecology of methanogens". *FEMS Microbiology Reviews*, v. 87, p.297-308.
- Ley 22/2011, de 28 de Julio, de residuos y suelos contaminados., BOE nº 181, de 29 de julio del 2011.
- Directiva 2010/75/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre las emisiones industriales (IPPC).
- Decreto 397/2010, de 2 de noviembre, por el que se aprueba el Plan Director Territorial de Residuos No Peligrosos de Andalucía 2010-2019, BOJA nº231, de 25 de noviembre de 2010.
- Real Decreto 824/2005, de 8 de julio, sobre productos fertilizantes.
- PNIR 2008-2015, Plan Nacional Integrado de Residuos: 2008-2015, aprobado en consejo de gobierno el 26 de diciembre de 2008. Publicado en el BOE el 26 de febrero de 2009.
- APHA; AWWA; WPCF. (1992). "Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales". Ed. Días de Santo, S.A.

- Fountoulakis, M.S.; Manios, T. (2009). Enhanced methane and hydrogen production from municipal solid waste and agro-industrial by-products co-digested with crude glycerol. *Bioresource Technology*, 100, 3043-3047.
- Fdez-Güelfo, L. A., (2008). “Caracterización cinética de la degradación anaerobia termofílica seca de la FORSU. Efecto de diferentes pretratamientos sobre la biodegradabilidad del residuo”. Tesis doctoral. Universidad de Cádiz.
- Da Siva, G. P.; Mark, M.; Contiero, J. (2009). Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*, 27:30-39.
- Zahedi. S.; (2013). “Producción de biohidrógeno y metano a partir de residuos sólidos urbanos. Dinámica poblacional”. Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz.
- Fernández, (2010). “Optimización de la digestión anaerobia seca de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU) en reactores en fases de temperatura”. Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz.
- Douglas A. Skoog; James J. Leary. *Análisis Instrumental*. Cuarta edición. México, D.F.: McGraw Hill. 1994.